

王伟梁, 张仙玉, 赵鑫, 等. *ETV5* 基因敲除对小鼠肌肉基因表达谱的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(2): 26-33.
WAN Weican, ZHANG Xianyu, ZHAO Xin, et al. Effect of *ETV5* knockout on gene expression profile in mouse muscle[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(2): 26-33.

ETV5 基因敲除对小鼠肌肉基因表达谱的影响

王伟梁, 张仙玉, 赵鑫, 李彬, 蔡更元, 杨化强, 徐铮
(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】与野生型小鼠相比较, 采用 CRISPR/Cas9 技术制备的 *ETV5* 基因纯合敲除小鼠在表现出内源性精原干细胞消融的同时伴随着体型和体质的明显弱势, 本研究的目的是探究 *ETV5* 基因敲除对小鼠肌肉表达谱的影响。【方法】采集 6 周龄的 3 只野生型公鼠和 3 只 *ETV5* 纯合敲除公鼠的肌肉组织并抽提 RNA, 进行转录组测序, 并对测序结果进行生物信息学分析, 对 2 组小鼠肌肉样品的差异表达基因进行聚类分析、GO 和 KEGG 富集分析。【结果】2 组小鼠的肌肉组织共筛选出了 574 个差异表达基因, 其中, 上调基因 292 个, 下调基因 282 个。发现了多个基因影响 *ETV5* 敲除小鼠的生长发育, 其中, 包括影响小鼠肌肉发育的基因 *Amd1* 和影响脂肪积累的基因 *Chrna2*。GO 和 KEGG 分析富集到的通路大多与脂肪代谢和生长发育相关。【结论】本研究结果为 *ETV5* 敲除小鼠生长发育缓慢和延迟的分子机制提供了解释, 为研究 *ETV5* 在生理和病理上的相关功能提供了参考。

关键词: *ETV5*; 转录组测序; 小鼠; 肌肉发育; 基因敲除; 基因表达谱

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)02-0026-08

Effect of *ETV5* knockout on gene expression profile in mouse muscle

WAN Weican, ZHANG Xianyu, ZHAO Xin, LI Bin, CAI Gengyuan, YANG Huaqiang, XU Zheng
(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】Compared with the wild type mice, the homozygous *ETV5* knockout mice prepared by CRISPR/Cas9 technology showed significant weakness in body size and body weight along with endogenous spermatogonial stem cell ablation. The purpose of this study was to explore the effect of *ETV5* knockout on the muscle expression profile of mice. 【Method】The muscle tissues of three wild-type male mice and three *ETV5* homozygous knockout male mice aged six weeks were collected and total RNA was extracted for transcriptome sequencing. We analyzed the sequencing results using bioinformatic method. Cluster analysis, GO and KEGG enrichment analyses were performed on the differentially expressed genes in the muscle samples of two groups of mice. 【Result】A total of 574 differentially expressed genes were screened out from the muscle tissues of two groups, including 292 up-regulated genes and 282 down-regulated genes. Several genes were found to affect the growth and development of *ETV5* knockout mice. These genes included *Amd1* affecting muscle development of mice, and *Chrna2* affecting fat accumulation. Most of the pathways enriched by GO and KEGG analyses were related to fat metabolism and growth and development. 【Conclusion】These results provide an explanation for the molecular mechanism of abnormal development of *ETV5* knockout mice, and provide references for further

收稿日期: 2021-06-16 网络首发时间: 2022-01-04 11:08:24

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20211231.1653.004.html>

作者简介: 王伟梁, 硕士研究生, 主要从事基因编辑小鼠肌肉发育异常的研究, E-mail: 478501743@qq.com; 通信作者: 杨化强, 副研究员, 博士, 主要从事大动物基因修饰、动物克隆、动物基因修饰育种和干细胞相关领域的研究, E-mail: yangh@scau.edu.cn; 徐铮, 高级实验师, 硕士, 主要从事动物健康养殖与安全生产方向的研究, E-mail: stonezen@scau.edu.cn

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019B1515210030)

study of *in vivo* function of *ETV5* gene.

Key words: *ETV5*; Transcriptome sequencing; Mouse; Muscular development; Gene knockout; Gene expression profile

转录因子能够调控基因的转录, 在发育过程中发挥着重要的作用, 并且转录因子的突变和许多疾病的发生有着紧密的联系^[1]。E26 转录因子 (E26 transcription-specific, ETS) 家族是转录因子家族之一, 它们在细胞的增殖、分化、迁移以及细胞的互作过程中起着重要的作用, 而根据序列的相似性, 又将 ETS 家族分成几个亚家族, 在哺乳动物中发现了将近 20 多个亚家族, 其中包括 ETS、ELG、TEL、PEA3 等^[2]。PEA3 亚家族由 3 个成员组成: ETV1、ETV4 和 ETV5^[3]。ETV5 也称 ETS 相关分子 (ETS related molecule, ERM), 在成年哺乳动物的组织中有着广泛的表达, 尤其在睾丸^[4] 和卵巢^[5] 中表达量较高。

精原干细胞是雄性动物产生精子的基础, 精原干细胞的研究对解决雄性不育症以及畜禽育种有着重要的推动作用, 精原干细胞移植是近年来比较难以攻克的研究问题, 其中如何制备内源性精原细胞消融的受体就是一个棘手的问题, 传统方法常将白消安注射到雄性受体的睾丸中使其内源性的精原细胞消融^[6], 但是此方法对动物的伤害很大, 并且雄性受体睾丸的精原细胞也无法做到完全消融, 不可避免地会有一定程度的恢复, 对后续试验的影响很大。随着基因编辑技术的发展, 研究者常利用基因修饰的手段敲除或失活某种在雄性哺乳动物睾丸精子发生过程中起关键作用的基因, 进而获得雄性睾丸内源性精原细胞消融理想的移植受体。Chen 等^[7] 利用 Cre-LoxP 技术靶向敲除了小鼠的 *ETV5* 基因, 制备了 *ETV5* 纯合敲除 (*ETV5*^{-/-}) 小鼠, 并发现敲除小鼠内源性精原细胞发生了消融且呈现出“唯支持细胞综合征”的表型, 成功地制备了内源性精原细胞消融的移植受体。同时研究发现, *ETV5*^{-/-} 雄性小鼠对雌性小鼠失去了性欲, 精子也没有受精能力, 无论是自然交配、人工授精还是体外受精都不能使野生型 (WT) 的雌性小鼠受孕。而且, 有报道称 *ETV5*^{-/-} 雌性小鼠也是不孕的^[8], 这是因为它们的卵巢出现了结构上的缺陷, 完全无法排卵, 和野生型小鼠交配后不能形成阴道栓。*ETV5* 敲除小鼠的成功制备实现了内源性精原细胞完全消融的雄性受体, 为精原干细胞的研究提供了重要的材料。

然而, *ETV5* 敲除小鼠不仅生殖系统的发育受到阻碍, 在其他身体发育机能上也有缺陷。Schlesser 等^[9] 靶向干扰小鼠的 *ETV5* 基因, 和野生型相比

ETV5 纯合突变小鼠的体质量减少 12%~31%。Jamsai 等^[10] 利用 ENU 诱变将小鼠的 *ETV5* 基因产生错义突变, 纯合 *ETV5* 突变的小鼠除了出现“唯支持细胞综合征”外, 还产生了肾脏不对称、多趾以及发育不良等症状。Zhang 等^[11] 为研究精原干细胞的移植, 利用 CRISPR/Cas9 技术制备了 *ETV5* 敲除小鼠, 试验结果和 Schlesser 等^[9] 以及 Jamsai 等^[10] 的研究结果相似, 敲除 *ETV5* 基因的小鼠除了出现内源性精原细胞的消融, 也出现了生长发育缓慢以及多趾的现象。

为了探究 *ETV5* 敲除小鼠生长发育缓慢的分子机制, 我们通过对 *ETV5* 纯合敲除小鼠和野生型小鼠的肌肉组织进行了转录组测序, 获得了 2 组小鼠肌肉组织的转录本数据, 并且通过生物信息学分析筛选了 *ETV5*^{-/-} 小鼠和野生型小鼠肌肉组织的差异表达基因, 以及敲除 *ETV5* 影响了小鼠其他哪些功能基因及信号通路。

1 材料与方法

1.1 *ETV5* 敲除小鼠的制备及基因型的检测

ETV5 敲除小鼠的制备是通过 CRISPR/Cas9 技术对 C57BL/6 小鼠的 *ETV5* 基因 (GenBank accession number: NM_023794.2; Ensembl: ENSMUSG00000013089) 进行靶向敲除得到的 (由苏州赛业生物科技有限公司完成)。设计了 *ETV5* 敲除小鼠的 sgRNA, 包括 sgRNA1 (GAACGGCCATTGTCGGTGGCAGG) 和 sgRNA2 (CTTCTATGCTAATAACGGGTGGG) 共获得 49 只 F₀ 代小鼠, 1 周龄时剪小鼠脚趾抽提 DNA, 通过 PCR 检测筛选出 3 只 F₀ 代 *ETV5* 基因杂合敲除小鼠 (2 公 1 母)。将杂合子小鼠和母鼠进行合笼繁殖, 留下它们的公鼠后代, 采集这些公鼠的尾巴, 抽提组织 DNA, 并进行基因型的 PCR 鉴定, 鉴定小鼠基因型的 PCR 引物包括上游引物 (Primer-F: 5'-CAACTGGTGGCCTTCCCAGTCT-3')、中间引物 (Primer-M: 5'-TTAGACATTAGGCAGAGCCAGTGATG-3')、下游引物 (Primer-R: 5'-GCCGCTCTTAAACCTGTTTCATTCG-3')。

1.2 小鼠的体质量测量

留下基因型检测结果为野生型 (WT) 的公鼠 (C57BL/6 小鼠) 和纯合敲除 (*ETV5*^{-/-}) 的公鼠, 待小鼠 6 周龄时, 选择 WT 小鼠和 *ETV5*^{-/-} 小鼠各 3 只, 依次放在电子秤上称量 6 只小鼠的体质量并记录。

1.3 样品收集和准备

1.3.1 肌肉样本的采集 称量过体质量的 6 只小鼠, 分别进行颈椎脱臼法处死, 将小鼠解剖采取小鼠后腿部位的肌肉, 分别放入标记好的冻存管中, 立即置于液氮中。

1.3.2 RNA 提取与检测 采用 Trizol 法提取小鼠肌肉组织的总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测分析样品 RNA 的完整性, 用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度和纯度, 用 Agilent 2100 bioanalyzer 精确检测 RNA 完整性。

1.4 文库的构建及测序

转录组测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成, 将 2 组小鼠肌肉的总 RNA 分别构建测序文库。首先通过磁珠法 Oligo(dT) 对带有 PolyA 尾的 mRNA 进行富集, 随后将其分割成短片段 mRNA, 用随机引物进行扩增, 逆转录合成第 1 条 cDNA 链, 随后采用 RNaseH、DNA Polymerase I、dNTPs 为原料降解 RNA 并且合成第 2 条 cDNA 链。使用 AMPure XP beads 纯化双链产物, 最后将 DNA 末端修复成平末端, 加 PolyA 尾、接头, 最终获得文库。文库质量合格后进行 Illumina 测序。

1.5 数据分析

1.5.1 数据质控 将测序片段的图像数据转化为序列数据 (Reads), 对原始数据进行过滤, 去除带接头的、无法确定碱基信息的、低质量的 Reads。同时, 对 Clean data 进行 Q20、Q30 和 GC 含量计算, 供后续分析。

1.5.2 RNA 比对及基因表达水平的测定 获得基础数据后, 直接从基因组网站下载参考基因组和基因模型注释文件, 使用 HISAT2 构建参考基因组的索引, 并将 Clean data 与参照基因组进行比对, HISAT2 可以基于基因模型注释文件生成拼接连接的数据库。利用 featureCounts 软件计算映射到每个基因的读数, 再根据基因的长度计算每个基因的 FPKM (FPKM 指每百万碱基对测序的转录本序列片段的每千碱基片段的预期数量), 并计算映射到该基因的读数。

1.5.3 差异表达分析 使用 DESeq2 软件进行 2 个组合之间差异表达分析^[12](每个组 3 个生物学重

复)。差异表达基因 (Differentially expressed gene, DEG) 是通过 DESeq2 选择阈值为 $P_{adj}<0.05$, $|\log_2(\text{差异倍数})|\geq 0$ 筛选出来的基因 (P_{adj} 是 Benjamini 和 Hochberg 法矫正后的 P 值)。通过 clusterProfiler 软件使用 Gene Ontology 数据库对差异表达基因进行 GO 富集分析。利用 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库找出差异表达基因显著富集的信号通路^[13], 用于分析分子水平的信息, 使用 clusterProfiler 软件分析 KEGG 通路中差异表达基因的统计富集。

1.5.4 实时荧光定量 PCR 验证 从差异表达基因中挑选了一部分进行了实时荧光定量 PCR(qPCR) 验证。反应体系为 10 μL : 5 μL 的 2 $\times$ SYBR Green MasterMix, 1 μL cDNA 模板, 0.3 μL 上、下游引物和 3.4 μL ddH₂O。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。每个基因做 3 个重复, 以 β -actin 作为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 小鼠的基因型鉴定

如图 1 所示, 如果小鼠是野生型小鼠, 经过 PCR 能根据引物 Primer-M 和 Primer-R 得到 460 bp 长度的片段, 如果小鼠是 ETV5 纯合敲除的小鼠, 则扩增出 Primer-F 到 Primer-R 之间的 1 段 710 bp 的序列, 同理, 如果是杂合敲除的小鼠, 则 2 种片段都有。因此, 可以根据 PCR 产物的大小判断小鼠的基因型。

选取部分后代小鼠中的公鼠, 提取组织 DNA 后, 用 PCR 法检测基因型, 结果如图 2 所示, 泳道 2、3、4 只扩增到 1 个条带 (460 bp), 说明所代表的这 3 只小鼠是野生型, 泳道 5、6、7 只扩增到 1 个条带 (710 bp), 说明所代表的这 3 只小鼠是纯合敲除, 泳道 8、9、10 扩增到 2 个条带 (710 和 460 bp), 说明所代表的这 3 只小鼠是杂合敲除。

ETV5 纯合敲除小鼠的 PCR 产物测序结果如图 3 所示, 将测序结果和 NCBI 上的小鼠 ETV5 基

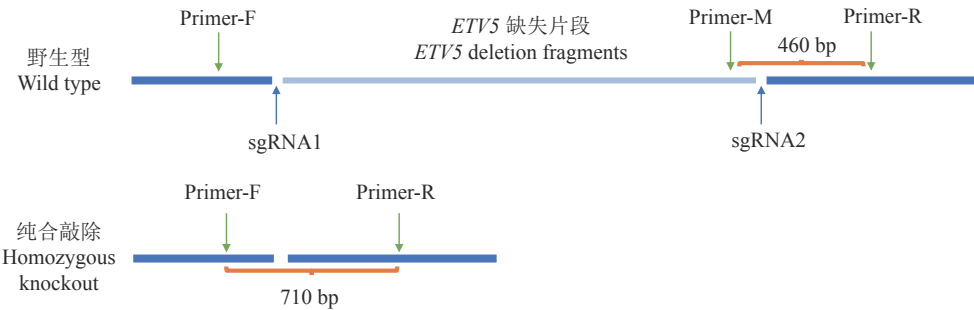


图 1 ETV5 敲除小鼠基因型鉴定原理图
Fig. 1 Identification principle of ETV5 knockout mouse genotype

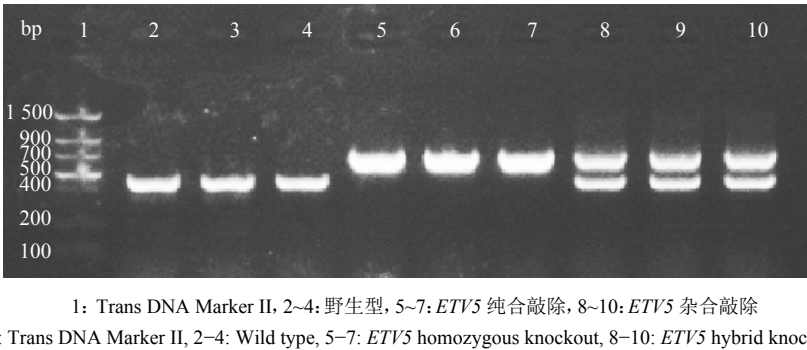


图 2 *ETV5* 基因敲除小鼠基因型鉴定

Fig. 2 Genotype identification of *ETV5* knockout mice

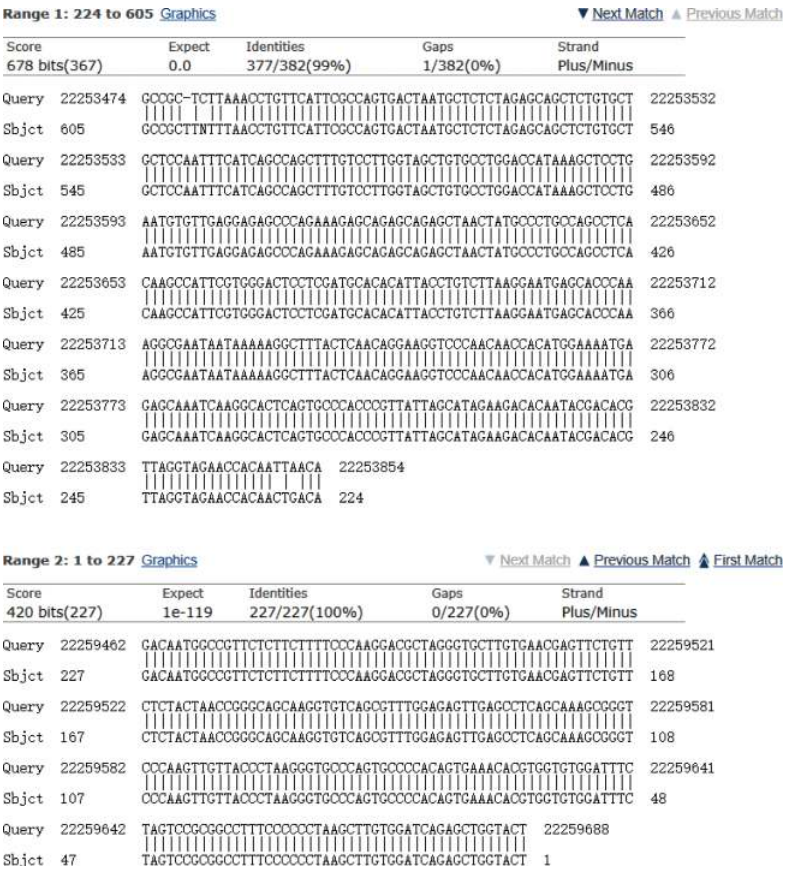


图 3 *ETV5* 纯合敲除小鼠测序结果和 NCBI 序列的比对

Fig. 3 Comparison of sequencing results of *ETV5* homozygous knockout mice and NCBI sequence

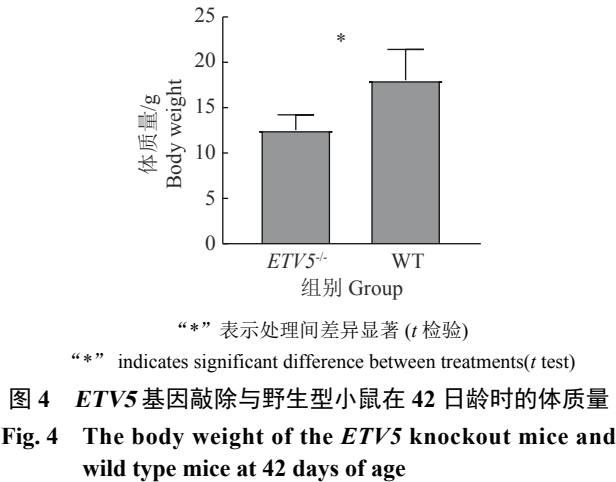
因序列进行比对, 结果显示, 从 22253855~22259641 缺失了 5607 个碱基。

2.2 2 组小鼠的体质质量比较

在 2 组小鼠 42 日龄时, 对它们的体质质量进行测量, 得到结果如图 4 所示, WT 组的体质质量显著高于 *ETV5*^{-/-} 组的体质质量。

2.3 参考基因组比对结果

根据比对结果, 分别统计 Reads 在基因组外显子区域 (Exon)、内含子区域 (Intron) 以及基因间区 (Intergenic) 所占的比例。WT 和 *ETV5*^{-/-} 组的比对结果基本一致, 大约 95% 的 Reads 比对到外显子区域。



2.4 差异表达基因

我们筛选出了 574 个差异表达基因, 其中上调基因 292 个, 下调基因 282 个。对这 574 个差异表达基因进行染色体定位, 结果如图 5 所示, 发现差

异表达基因在 11 号染色体最多, 其次是 5 号染色体。图 6 的热图显示筛选出的差异表达基因的上、下调水平。部分差异表达基因见表 1。

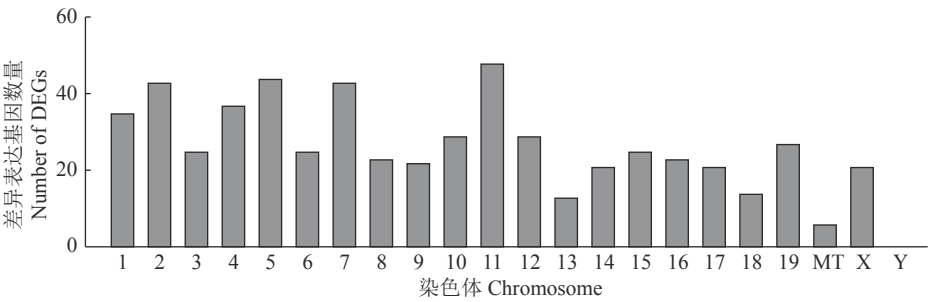
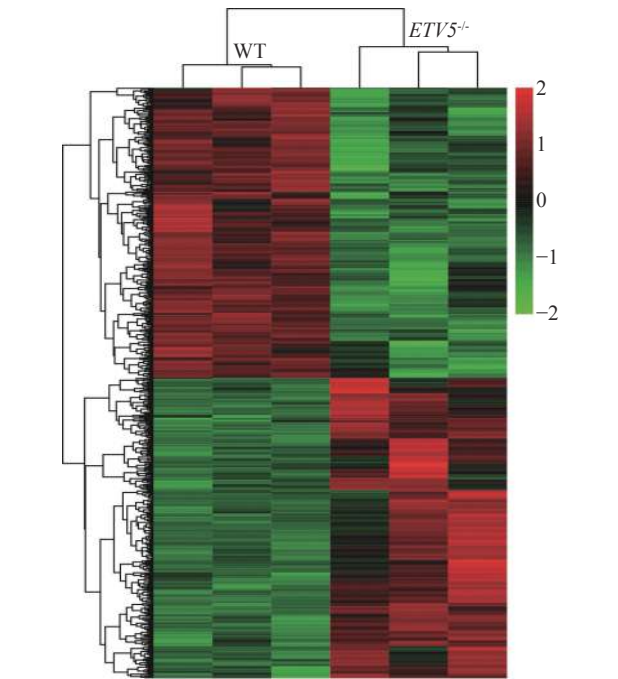


图 5 差异表达基因在各染色体上的分布
Fig. 5 Distribution of DEGs on each chromosome



红色代表上调, 绿色代表下调
Red color represents up-regulation, and green color represents down-regulation

图 6 小鼠肌肉组织中的差异表达基因聚类热图
Fig. 6 Clustering heat map of DEGs in mouse muscle tissue

2.5 GO 富集分析

为了进一步解析筛选出来的差异表达基因的功能, 我们进行了 GO 富集分析, 结果如图 7 所示。富集在生物学过程的最多, 其中在生物过程中富集程度前 5 的都与脂肪代谢相关, 包括: 脂肪酸代谢、脂质氧化、脂质分解代谢、脂肪细胞分化、脂肪酸氧化。显著富集的细胞组成相对较少, 只有 5 个, 分别是: 线粒体内膜、细胞器内膜、脂滴、细胞外基质、受体复合体。前 5 个显著富集的分子功能分别是: 辅酶结合、生长因子结合、硫化化合物结合、脂肪-酰基-辅酶 A 结合、胰岛素样生长因子结合。

表 1 部分差异表达基因

Table 1 Partial DEGs			
上调基因 Up-regulated gene	FC ¹⁾	下调基因 Down-regulated gene	FC ¹⁾
<i>Chrna9</i>	7.715 1	<i>Acaa2</i>	-0.996 6
<i>Cdsn</i>	6.990 6	<i>Ccdc85a</i>	-1.018 3
<i>Adrb3</i>	6.857 1	<i>Homer2</i>	-1.046 8
<i>Retn</i>	4.866 9	<i>Crispld2</i>	-1.050 8
<i>Slc7a10</i>	4.269 1	<i>Rcan2</i>	-1.093 1
<i>Fasn</i>	3.977 7	<i>Rhobtb1</i>	-1.103 9
<i>Acaa1b</i>	3.831 6	<i>Khdrbs3</i>	-1.134 6
<i>Cidec</i>	3.550 0	<i>Spon1</i>	-1.180 9
<i>Katnal2</i>	3.097 6	<i>Nudt18</i>	-1.217 9
<i>Elovl6</i>	3.085 9	<i>Rps6ka1</i>	-1.261 2
<i>Spon2</i>	3.002 9	<i>Gdap1</i>	-1.271 1
<i>Adig</i>	2.862 4	<i>Nceh1</i>	-1.369 2
<i>Rbp4</i>	2.803 4	<i>Map2k6</i>	-1.461 6
<i>Eda2r</i>	2.554 9	<i>Grb14</i>	-1.541 7
<i>Agpat2</i>	2.448 0	<i>Dbp</i>	-1.758 3
<i>Smoc1</i>	2.408 5	<i>Plin5</i>	-1.799 0
<i>Igf2</i>	2.291 3	<i>Hpn</i>	-1.916 1
<i>Ankrd1</i>	2.149 7	<i>Smox</i>	-2.029 1
<i>Meg3</i>	2.077 7	<i>Fabp3</i>	-2.049 3
<i>B3galt2</i>	2.076 6	<i>Mylk4</i>	-2.081 2
<i>Slc1a3</i>	2.057 6	<i>Mchr1</i>	-2.175 5
<i>Perp</i>	2.005 2	<i>Fabp3-ps1</i>	-2.176 0
<i>Peg3</i>	1.989 6	<i>Cacna2d4</i>	-2.225 7
<i>Igfn1</i>	1.984 6	<i>Amd2</i>	-2.673 0
<i>Dapk1</i>	1.887 2	<i>Bdh1</i>	-2.909 0
<i>Pde3b</i>	1.708 4	<i>Wisp2</i>	-2.935 7
<i>Tbc1d31</i>	1.635 5	<i>Amd-ps4</i>	-2.957 5
<i>Fst</i>	1.391 9	<i>Amd1</i>	-3.007 9
<i>Thbs1</i>	1.382 1	<i>Gapdh</i>	-3.708 5
<i>Il20rb</i>	1.380 7	<i>Chrna2</i>	-4.877 8
<i>Cd28</i>	1.319 1	<i>Fam19a4</i>	-5.151 6
<i>Apoe</i>	0.997 8	<i>Etv5</i>	-6.886 2

1) FC表示log₂ (差异倍数)
1) FC indicates log₂ (Fold change)

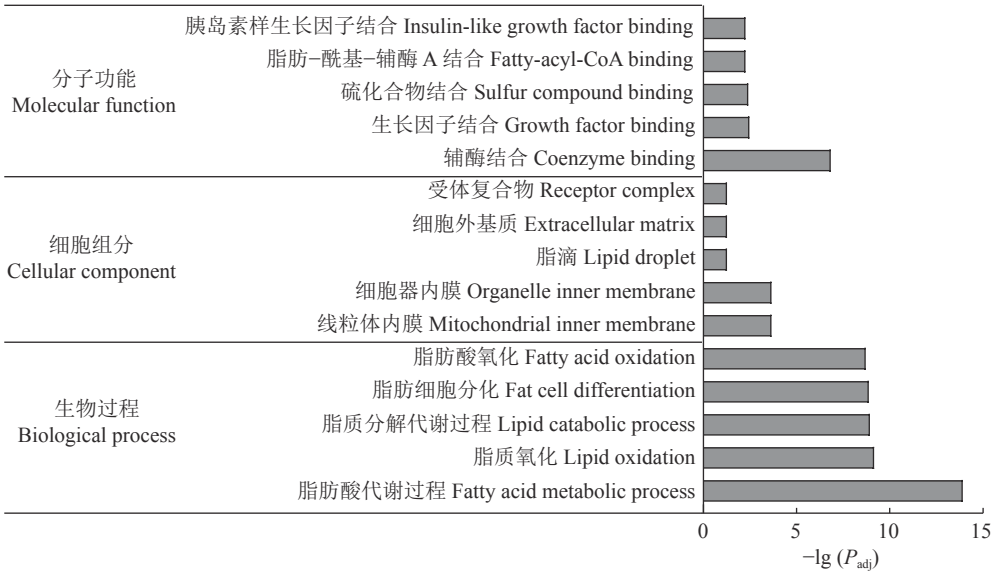


图 7 *ETV5* 基因敲除与野生型小鼠肌肉组织差异表达基因 GO 富集分析

Fig. 7 Enrichment analysis of DEGs between *ETV5* knockout mice and wild type mice muscle

2.6 KEGG 富集分析

我们还对差异表达基因进行了 KEGG 富集分析, 图 8 结果表明有 20 条 KEGG 通路得到显著富集, 其中差异表达基因主要富集到代谢通路中, 例如: 脂肪酸代谢、cAMP 信号通路、PPAR 信号通路、AMPK 信号通路、不饱和脂肪酸生物合成、脂肪酸降解和丙酮酸代谢等。

2.7 qPCR 验证分析

将分析得到的部分差异表达基因进行了 qPCR 验证, 结果显示与测序结果一致 (图 9), 敲除 *ETV5* 基因影响了部分其他基因的表达, 其中腺苷甲硫氨酸脱羧酶 1(Adenosylmethionine decarboxylase 1, Amd1)^[14] 的 cDNA 编码肌源性碱性螺旋-环-螺旋 (Basic helix-loop-helix, bHLH) 因子的一个家族成

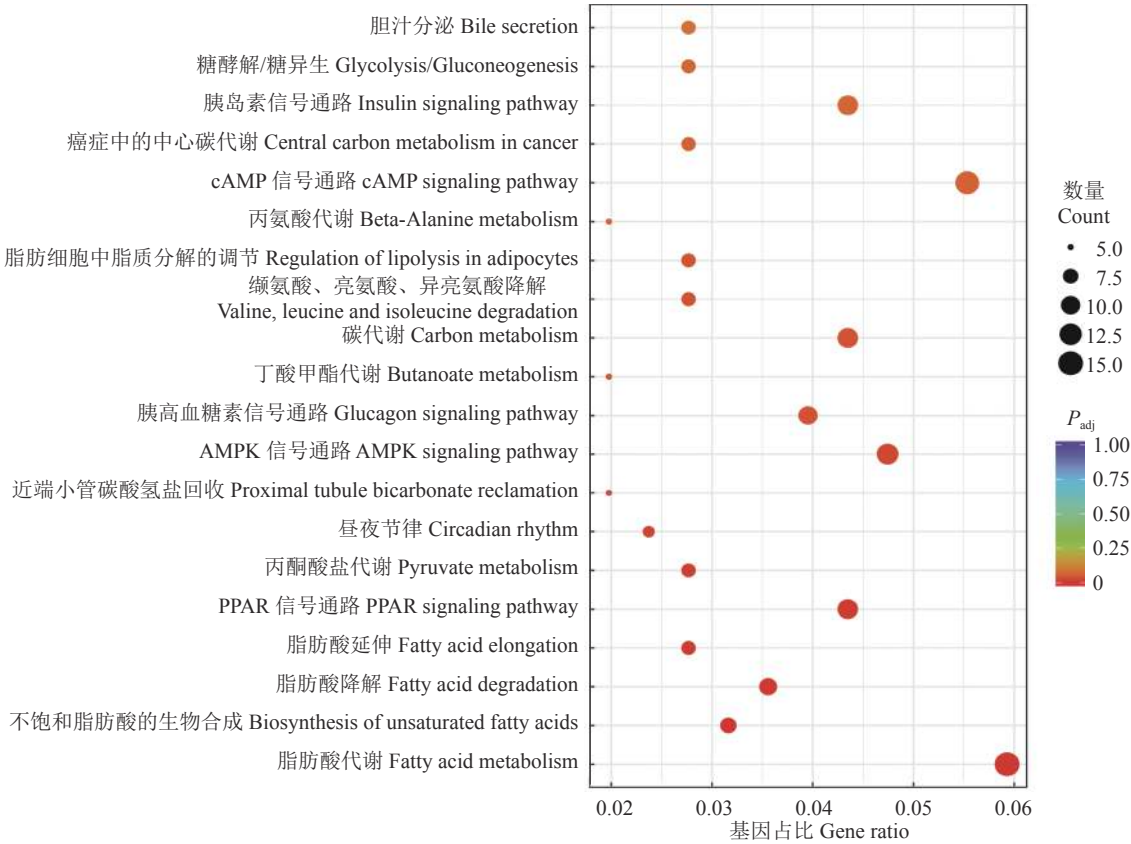
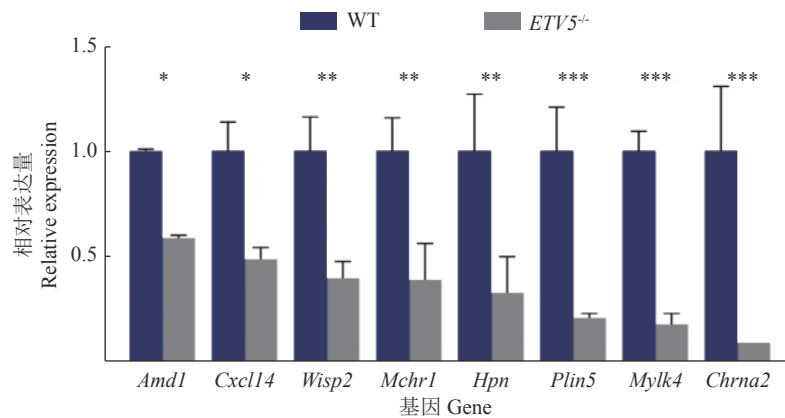


图 8 *ETV5* 基因敲除与野生型小鼠肌肉组织差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig. 8 KEGG enrichment analysis of DEGs between *ETV5* knockout mice and wild type mice muscle



柱子上的“*” “**” “***” 分别表示 2 组差异达到 0.05、0.01 和 0.001 的显著水平 (t 检验)
“*” “**” “***” on bars indicate significant difference between two groups at the levels of 0.05, 0.01 and 0.001, respectively (t test)

图 9 qPCR 检验差异表达基因在 ETV5 基因敲除和野生型小鼠肌肉组织的相对表达量

Fig. 9 Detecting the relative expression of DEGs in muscle tissue of ETV5 knockout and wild type mice by qPCR

员,此外, *Amd1* 基因在成人体壁肌肉中有明显表达,但在心脏和其他非肌肉组织中未见表达,肌源性 bHLH 因子参与了肌肉发育和形成。另外,胆碱能受体烟碱 $\alpha 2$ (Cholinergic receptor nicotinic alpha 2, *Chrna2*) 对脂肪的形成和代谢有重要作用,Jun 等^[15] 敲除了小鼠的 *Chrna2* 基因,发现由于小鼠体内脂肪细胞自主调节异常,导致了小鼠在寒冷环境中产热和代谢功能的障碍,揭示了 *Chrna2* 通路在米色脂肪生物发生和能量稳态中的生物学意义。除此之外,差异表达基因中还有 *Hpn*^[16], *Wisp2*^[17], *Cxcl14*^[18], *Mylk4*^[19], *Plin5*^[20], *Mchr1*^[21] 等一些基因影响了 *ETV5* 敲除小鼠的肌肉发育、脂肪累积和体质量变化。

3 讨论与结论

Wang 等^[22] 前期通过基因编辑技术制备了 *ETV5* 基因敲除的小鼠模型用来研究该基因与精原干细胞发育的关系,但是基因编辑带来的影响并不是单一的,虽然敲除小鼠的 *ETV5* 基因的确得到了内源性精原细胞消融的“唯支持细胞综合征”表型,但是同时也影响了小鼠的整体发育和生长,而产生这些表型的分子机制很少有人报道。为此,我们通过转录组测序得到了 *ETV5* 敲除小鼠和野生型小鼠的转录本,分析两者之间存在的差异表达基因,通过生物信息学的方法分析得到了敲除 *ETV5* 基因可能对小鼠产生影响的分子机制。结果表明,敲除 *ETV5* 后的小鼠与野生型小鼠相比差异表达基因大部分为编码蛋白的基因,差异表达基因中的部分基因对动物的生长发育、肌肉发育以及脂肪累积等有不同的影响,从而影响了 *ETV5* 敲除小鼠的肌肉发育和脂肪累积,出现体质量下降以及发育不良的现象。

GO 富集分析的结果显示,富集前 5 的生物学

过程都与脂肪代谢相关,分别是:脂肪酸代谢、脂质氧化、脂质分解代谢、脂肪细胞分化、脂肪酸氧化。这表明,敲除 *ETV5* 基因对小鼠的脂肪代谢影响很大,可能导致了小鼠储存脂肪的障碍。KEGG 富集分析的结果显示,所有差异表达基因主要富集在脂肪酸代谢、cAMP 信号通路、PPAR 信号通路、AMPK 信号通路等方面。PPAR 通路可以调节脂质代谢、脂肪形成、维持代谢的稳态以及炎症基因的表达。PPAR 在不同的物种中找到了 3 种亚型,PPAR α 通过调节参与肝脏和骨骼肌脂质代谢基因的表达以在细胞脂质中发挥作用^[23],PPAR β/δ 参与脂质分解代谢、葡萄糖稳态、炎症、生存、增殖、分化以及哺乳动物皮肤、骨骼和肝脏的再生^[24],PPAR γ 可调节糖和脂代谢、内皮功能和炎症^[25]。测序结果中的 *Plin5*、*Fabp3* 等部分差异表达基因在 PPAR 通路中起作用。GO 和 KEGG 分析的结果表明,敲除 *ETV5* 基因可能会影响小鼠的脂肪代谢、能量代谢以及整体的发育。

本研究对 *ETV5* 敲除小鼠和野生型小鼠的肌肉组织进行了转录组测序分析,以探究敲除 *ETV5* 基因对小鼠肌肉形成以及生长发育相关基因和信号通路的影响。结果表明,我们筛选出了 574 个差异表达基因,这些差异表达基因大多与脂肪代谢以及生长发育相关,其中发现 *Amd1* 可能影响了 *ETV5* 敲除小鼠的肌肉发育, *Chrna2* 可能影响了 *ETV5* 敲除小鼠的脂肪代谢。GO 和 KEGG 分析显示差异表达基因主要富集在脂肪代谢、能量代谢的通路,这也能对应我们观察到 *ETV5* 敲除小鼠发育不良的表型。这些结果为敲除 *ETV5* 基因导致小鼠发育的缓慢和延迟提供了解释,以及为研究 *ETV5* 基因的体内多样性功能提供了参考。

参考文献:

- [1] LATCHMAN D S. Transcription-factor mutations and disease[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1996, 334(1): 28-33.
- [2] SHARROCKS A D. The ETS-domain transcription factor family[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2(11): 827-837.
- [3] OH S, SHIN S, JANKNECHT R. ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1826(1): 1-12.
- [4] O'BRYAN M K, GREALLY A, STAHL P J, et al. Genetic variants in the *ETV5* gene in fertile and infertile men with nonobstructive azoospermia associated with Sertoli cell-only syndrome[J]. *Fertility and Sterility*, 2012, 98(4): 827-835.
- [5] EO J, HAN K, MURPHY M K, et al. ETV5, an ETS transcription factor, is expressed in granulosa and cumulus cells and serves as a transcriptional regulator of the cyclooxygenase-2[J]. *The Journal of Endocrinology*, 2008, 198(2): 281-290.
- [6] BRINSTER R L, AVARBOCK M R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(24): 11303-11307.
- [7] CHEN C, OUYANG W, GRIGURA V, et al. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche[J]. *Nature*, 2005, 436(7053): 1030-1034.
- [8] EO J, SHIN H, KWON S, et al. Complex ovarian defects lead to infertility in *Etv5*^{-/-} female mice[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2011, 17(9): 568-576.
- [9] SCHLESSER H N, SIMON L, HOFMANN M C, et al. Effects of ETV5 (ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(3): 483-489.
- [10] JAMSAI D, CLARK B J, SMITH S J, et al. A missense mutation in the transcription factor ETV5 leads to sterility, increased embryonic and perinatal death, postnatal growth restriction, renal asymmetry and polydactyly in the mouse[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77311.
- [11] ZHANG X, ZHAO X, LI G, et al. Establishment of *Etv5* gene knockout mice as a recipient model for spermatogonial stem cell transplantation[J]. *Biology Open*, 2021, 10(1). doi: 10.1242/bio.056804.
- [12] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [13] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30.
- [14] ARAKI S, SAIGA H, MAKABE K W, et al. Expression of *AMD1*, a gene for a MyoD1-related factor in the ascidian *Halocynthia roretzi*[J]. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 1994, 203(6): 320-327.
- [15] JUN H, MA Y, CHEN Y, et al. Adrenergic-independent signaling via CHRNA2 regulates beige fat activation[J]. *Developmental cell*, 2020, 54(1): 106-116.
- [16] LUO J, XU Q, JIANG B, et al. Selectivity, cell permeability and oral availability studies of novel bromophenol derivative HPN as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(1): 140-153.
- [17] GRUNBERG J R, HOFFMANN J M, HEDJAZIFAR S, et al. Overexpressing the novel autocrine/endocrine adipokine WISP2 induces hyperplasia of the heart, white and brown adipose tissues and prevents insulin resistance[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43515.
- [18] CEREIJO R, GAVALDA-NAVARRO A, CAIRO M, et al. CXCL14, a brown adipokine that mediates brown-fat-to-macrophage communication in thermogenic adaptation[J]. *Cell Metabolism*, 2018, 28(5): 750-763.
- [19] SAKAKIBARA I, YANAGIHARA Y, HIMORI K, et al. Myofiber androgen receptor increases muscle strength mediated by a skeletal muscle splicing variant of Mylk4[J]. *iScience*, 2021, 24(4): 102303.
- [20] MASON R R, MOKHTAR R, MATZARIS M, et al. PLIN5 deletion remodels intracellular lipid composition and causes insulin resistance in muscle[J]. *Molecular Metabolism*, 2014, 3(6): 652-663.
- [21] BJURSELL M, GERDIN A K, PLOJ K, et al. Melanin-concentrating hormone receptor 1 deficiency increases insulin sensitivity in obese leptin-deficient mice without affecting body weight[J]. *Diabetes*, 2006, 55(3): 725-733.
- [22] WANG Y, DING Y, LI J. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1622: 293-305.
- [23] GRABACKA M, PIERZCHALSKA M, DEAN M, et al. Regulation of ketone body metabolism and the role of PPARα[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(12): 2093.
- [24] MAGADUM A, ENGEL F B. PPARβ/δ: Linking metabolism to regeneration[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 2013.
- [25] WANG S, DOUGHERTY E J, DANNER R L. PPARγ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics[J]. *Pharmacological Research*, 2016, 111: 76-85.

【责任编辑 庄 延】